

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP99/5467



4

REC'D	26 NOV 1999
WIPO	PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 1. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Aktenzeichen: 198 45 231.4

erofsky

M 28.10.98

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xyloose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
10
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
15
- 20 3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
25
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
30
- 35 5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
40
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in 5 Pflanzen

Beschreibung

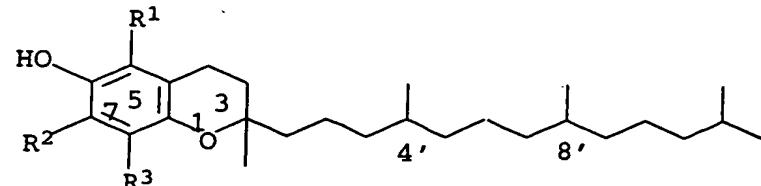
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung von DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

20

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):

35



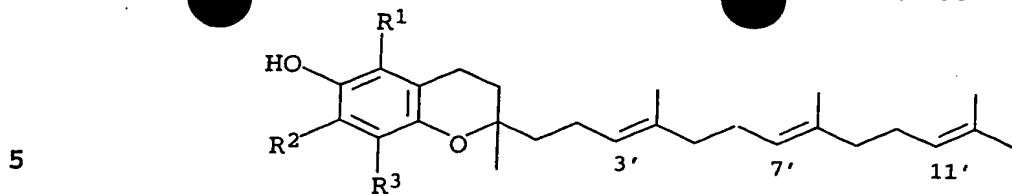
40 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

M 20 · 10 · 80



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$
 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = CH_3, R^2 = H$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = H, R^2 = R^3 = CH_3$
 10 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = H, R^3 = CH_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

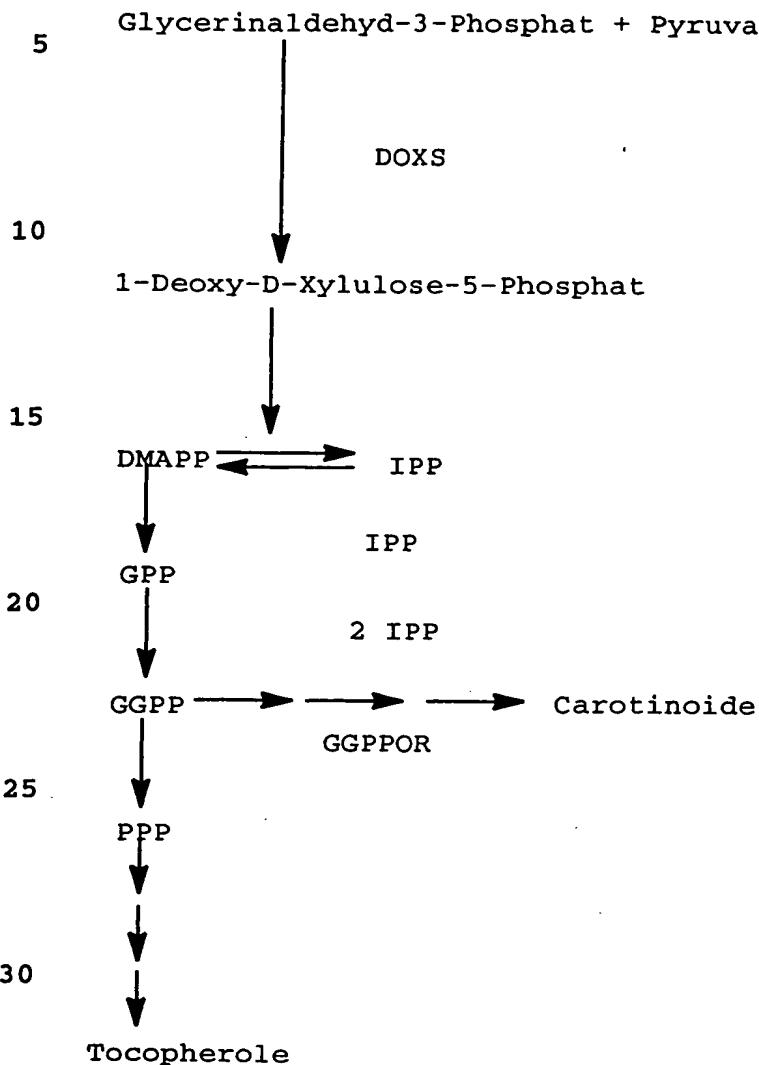
Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt
 15 durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl
 sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt be-
 reits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können
 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert
 werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen
 20 gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Se-
 lektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise
 mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch
 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf
 Pflanzen der selben Art beschränkt.

25 Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthe-
 segene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen,
 dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren
 30 setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt
 ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, iden-
 tifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen
 35 lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus
 C_5 -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.
 Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Iso-
 pren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B.
 Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem
 40 aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-
 CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und
 Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C_5), dem Isopentenylpy-
 45 rophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in
 vivo Fütterungsexperimente mit C^{13} gezeigt, daß in verschiedenen

Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414 (1), 129-134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94 (2), 40600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (5), 2100-2104 (1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400 (3), 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, wäh-

rend die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflußt ist (Bach und Lichtenthaler, Physiol. Plant 59 (1993), 50-60). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären 5 Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyro- 10 phosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅), Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyro- 15 phosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, 20 deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxy-phenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phy- 25 tylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosyl-methionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

30

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktonal beeinflußen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen mit- 35 einander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, Plant Mol. Biol. 22(4), 589-602 (1993); Fray et al., Plant J., 8, 693-701 (1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium 40 Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624 (1996)).

45

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus *E.coli* erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene erreicht werden. DOXS-Nukleotidsequenzen sind aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

Hierzu wird beispielsweise das DOXS-Gen aus *E.coli* (SEQ-ID No. 1; Rosa Putra et al., Tetrahedron Lett. 39 (1998), 23-26; Acc. No. 035440) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten wird der *E.coli* DOXS in einem weiteren Konstrukt eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.

40

Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von

Phytolpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytolpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ-ID No. 5) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten ist der *Arabidopsis* GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 4 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben.

15 Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens 20 gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisinsäure erreicht.

25 cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 3 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* beschrieben (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 3). Um eine Plastidenlokalisierung zu gewährleisten ist der HPPD aus *Streptomyces* eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 3 hybridisiert und das aus anderen Organismen 35 bzw. aus Pflanzen stammt.

Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der Phytolpyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte 40 Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

45 Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD-Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 5). Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K,

Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS, 5 eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nuklein- säuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende 10 Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nuklein- 15 säuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere 20 regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente der- 25 art, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht dar- auf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewähr- leistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Va- 30 kuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Reti- kulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Komparti- menten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

35

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promo- 40 tor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopaline-Synthase-Promotor
- 45 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

11088

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-, HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein

chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 5 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 20 30 (1996), 781-792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

35 Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTCTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGGCGTACTCCTCCGCGCCGCCGCGTCG

5 TAAGGTCACCGGCATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACGTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
10 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCACTTCCCCTCTCTCACTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCACCTCCCGCCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTGCG
TAAGGTACCGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAGACTGCGCTG
GATCC_BamHI

15 pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCTCACTTTCCGGCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTCCTCCGCCGCCGCCGTG
TAAGGTCACCGGGCATTCTGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAA
ACTGAGACTGCGGGG

20 ATCC_BamHI

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS, HPPD bzw. GGPPOR kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Be-
25 standteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Genabschnitten verschiedener Organismen beste-
hen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten
30 Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessan-
ten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßiger-
weise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten
35 Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange-
setzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze

sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind ge-
5 geneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,
10 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden
15 der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die
20 durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

25 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids
30 pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz
35 KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für
40 ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie
45 z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

12

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 5 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens, eines HPPD-Gens bzw. eines GGPPOR-Gens enthalten.

10

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, 15 beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

20 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet 25 sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, 30 SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

35

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie 40 deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin 45 K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).
- Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebräuch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS, HPPD bzw. GGPPOR kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin

enthaltenden kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der

Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des DOXS-, des 5 HPPD- und des GGPPOR-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-, HPPD- und GGPPOR-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßme- 10 ristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-, des HPPD- bzw. des GGPPOR-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

15 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hy-bridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt 20 sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Al-falfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

25 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ 30 ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart herge- stellt transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfin- dung.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz SEQ 35 ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht werden. Die derart herge- stellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfin- dung.

40 Durch Überexpression der für eine GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 5 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegen- stand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 1, einer für die HPPD kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 3 und einer für die GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ-ID No. 5 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS, der HPPD und der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 10 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 15 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS, der HPPD und der GGPPOR durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen.
- 20 - Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 25 - Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.
- 30

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel-elektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

15

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

20

Beispiel 1

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

25

Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert 30 wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-35 Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 40 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

45

18

Beispiel

Isolierung der DOXS aus E. coli

- 5 Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende um-faßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTT-GATATTGCCAAATAC-3'
- 10 (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem 15 Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI ent-haltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli einge-setzt. Das PCR-Programm lautete:
- 20
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C
- 25 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Se-quenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen ent-sprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das 30 Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 3 und 4 darge-stellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:
- 35
- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Vi-rus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Trans-40 ketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-ter-mination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus *E. coli* eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

- 10 Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 1). Dabei wurden zwei 15 nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

20 Beispiel 3

Klonierung des Gens einer HPPD aus *Streptomyces avermitilis* U11864

- 25 Isolierung genomicscher DNA des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* U11864:

Eine Kultur von *Streptomyces avermitilis* U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für 30 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomicsche DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/35 Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die 40 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das 5 Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA- CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGGCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

10

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

15

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

20

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)

25

gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin), vor 25 dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

30

Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im

35

Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre

40

Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus).

45

Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination.

45

21 20 00 90

Beispiel 4

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*5 Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfalteten Blättern von *Arabidopsis thaliana*:

Voll entfaltete Blätter von *A. thaliana* wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend 10 im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand 15 in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-20 Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von *A. thaliana*:

25 20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetatlösung und 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 µl Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

35 Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem.(1998)251(1-2), 413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine SalI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid 40 am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGACGGTTACACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGATAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min

5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min

25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

10 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 5).
15 Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktionschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist 25 in Abbildung 7 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

35 Beispiel 5

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

40 Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 8). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 4 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vektor 45 vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromy-

cin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine 5 andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktions- 10 schnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das 15 Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC-CCCGGCCGCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli- 20 Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als 25 Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
20 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz 25 wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Gen- 30 produkts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR2-TP-p-HPPD.

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR2-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids 35 pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTT- 40 CATGGAGTAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von 45 Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen

Vektor pBIN19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721)
übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Trans-
 5 ketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssi-
 gnal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den
 Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligo-
 10 nukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) an-
 lagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des
 Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv
 geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTGGACAAATCAGTAAATTGAAACGGA-
 G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH,
 15 Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-
 Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit
 der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-
 Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend ge-
 schnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrie-
 20 ben die Sequenz der HPPD enthielt.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-
 25 termination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich
 30 an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch
 35 Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD- und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR-HPPD (Abbildung 8), dessen Fragmente folgende Bedeutung
 40 haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination.

Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 6

5

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränder-
ten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit
10 Sequenzen der DOXS, der HPPD und der GGPPOR transformiert. Zur
Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selekt-
tion gewachsenen Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens*
abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in
15 gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In
einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen
(Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. An-
schließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium
(Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) mit 2% Sac-
20 charose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation
im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamy-
cin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l
Naphtylessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar über-
tragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel-
heit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-
25 Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar
überführt.

Beispiel 7

30

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränder-
ten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Proto-
35 koll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Po-
trykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Sprin-
ger Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen
der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

40 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens*
Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren
wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den
gesamten cDNAs der DOXS, der HPPD und der GGPPOR verwendet. In
allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminator-
45 sequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA
des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-
termination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v)

Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtkultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/1) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds,

Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

5

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS, der HPPD und der GGPPOR wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-10 Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtp-15 flanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 067056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698
- (H) TELEFAX: 0621-60-48821

(ii) ANMELDETITEL: DNA-Sequenzen codierend für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR und deren Überexpression in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1863 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase
- (B) STAMM: E.coli XL1 Blue

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1863

(x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG AGT TTT GAT ATT GCC AAA TAC CCG ACC CTG GCA CTG GTC GAC TCC
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1

5

10

15

ACC CAG GAG TTA CGA CTG TTG CCG AAA GAG AGT TTA CCG AAA CTC TGC
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys

20

25

30

GAC GAA CTG CGC CGC TAT TTA CTC GAC AGC GTG AGC CGT TCC AGC GGG

48

96

144

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly	35	40	45	
CAC TTC GCC TCC GGG CTG GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC				192
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His				
50	55	60		
TAT GTC TAC AAC ACC CCG TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT				240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His				
65	70	75	80	
CAG GCT TAT CCG CAT AAA ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC				288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly				
85	90	95		
ACC ATC CGT CAG AAA GGC GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA				336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu				
100	105	110		
AGC GAA TAT GAC GTA TTA AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT				384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser				
115	120	125		
GCC GGA ATT GGT ATT GCG GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC				432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg				
130	135	140		
CGC ACC GTC TGT GTC ATT GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG				480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala				
145	150	155	160	
TTT GAA GCG ATG AAT CAC GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG				528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val				
165	170	175		
ATT CTC AAC GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC				576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu				
180	185	190		
AAC AAC CAT CTG GCA CAG CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG				624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu				
195	200	205		
CGC GAA GGC GGG AAA AAA GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG				672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu				
210	215	220		
CTG CTC AAA CGC ACC GAA GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC				720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly				
225	230	235	240	
ACG TTG TTT GAA GAG CTG GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT				768
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly				
245	250	255		
CAC GAT GTG CTG GGG CTT ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG				816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu				
260	265	270		
AAA GGC CCG CAG TTC CTG CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT				864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr				
275	280	285		

M 000 10 90

GAA CCG GCA G[REDACTED] AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC CCG GTG CCT AAA TTT 912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
290 295 300
GAT CCC TCC AGC GGT TGT TTG CCG AAA AGT AGC GGC GGT TTG CCG AGC 960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305 310 315 320
TAT TCA AAA ATC TTT GGC GAC TGG TTG TGC GAA ACG GCA GCG AAA GAC 1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
325 330 335
AAC AAG CTG ATG GCG ATT ACT CCG GCG ATG CGT GAA GGT TCC GGC ATG 1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
340 345 350
GTC GAG TTT TCA CGT AAA TTC CCG GAT CGC TAC TTC GAC GTG GCA ATT 1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
355 360 365
GCC GAG CAA CAC GCG GTG ACC TTT GCT GCG GGT CTG GCG ATT GGT GGG 1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380
TAC AAA CCC ATT GTC GCG ATT TAC TCC ACT TTC CTG CAA CGC GCC TAT 1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400
GAT CAG GTG CTG CAT GAC GTG GCG ATT CAA AAG CTT CCG GTC CTG TTC 1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415
GCC ATC GAC CGC GCG GGC ATT GTT GGT GCT GAC GGT CAA ACC CAT CAG 1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430
GGT GCT TTT GAT CTC TCT TAC CTG CGC TGC ATA CCG GAA ATG GTC ATT 1344
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445
ATG ACC CCG AGC GAT GAA AAC GAA TGT CCG CAG ATG CTC TAT ACC GGC 1392
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460
TAT CAC TAT AAC GAT GGC CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC 1440
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480
GCG GTC GGC GTG GAA CTG ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA 1488
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
485 490 495
GGC ATT GTG AAG CGT CGT GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT 1536
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510
ACG CTG ATG CCA GAA GCG GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG 1584
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525
CTG GTC GAT ATG CGT TTT GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG 1632
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu

31 200 0 0 0

530	535	540	
GAA ATG GCC GCC AGC CAT GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC			1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala			
545	550	555	560
ATT ATG GGC GGC GCA GGC AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT			1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His			
565	570	575	
CGT AAA CCA GTA CCC GTG CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT			1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile			
580	585	590	
CCG CAA GGA ACT CAG GAA GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC			1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala			
595	600	605	
GCT GGT ATG GAA GCC AAA ATC AAG GCC TGG CTG GCA TA			1863
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala			
610	615	620	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 620 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser			
1	5	10	15
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys			
20	25	30	
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly			
35	40	45	
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His			
50	55	60	
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His			
65	70	75	80
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly			
85	90	95	
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu			
100	105	110	
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser			
115	120	125	
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg			
130	135	140	
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala			
145	150	155	160
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val			
165	170	175	
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu			
180	185	190	

32

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
195 200 205
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
210 215 220
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
225 230 235 240
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
245 250 255
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
260 265 270
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
275 280 285
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe
290 295 300
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser
305 310 315 320
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp
325 330 335
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met
340 345 350
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile
355 360 365
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly
370 375 380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
465 470 475 480
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
485 490 495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
500 505 510
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
515 520 525
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
530 535 540
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
545 550 555 560
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His

565

570

575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1469 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase
- (B) STAMM: Streptomyces avermitilis
- (C) INDIVIDUUM ISOLAT: U11864

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 218..1138

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GATATCCGAG CGCCGCCGGG TCCACTGCGG TCCGAAGCCG CGGATGACTC CATTGACTG	60
AAGCCGGTCG AGCCGCGCCT GCACGGTGCC GCGCGCGACC CCGAGCCGCC GGGACATCTC	120
GAGCACTCCG ATGCGCGGCT CCCGCGCCAG CAGCACCAAGG AGCCGGCCGT CCAGATGATC	180
GATGCCACG GCAGCCCCCTC CAGTGGTCAT CCTGTAC ATG CAG CCC CAC GCC ATG	235
Met Gln Pro His Ala Met	
1 5	
GGC GGT GCA CTG AAC ACA TTG TCC AGC GGA CAA GCC AAC TAT TGC GCA	283
Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala	
10 15 20	
CCT TGC GGA ACG GAG CGA CCC TGC CGC CAT GAC GCA GAC CAC ACA CCA	331
Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro	
25 30 35	
CAC TCC CGA CAC CGC CCG GCA GGC CGA CCC CTT CCC GGT GAA GGG AAT	379
His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn	
40 45 50	
GGA CGC GGT CGT CTT CGC CGT AGG CAA CGC CAA GCA GGC CGC GCA CTA	427
Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu	
55 60 65 70	
CTC CAC CGC CTT CGG CAT GCA GCT TGT GGC GTA CTC CGG ACC GGA GAA	475

34

Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly Val Leu Arg Thr Gly Glu
75 80 85

CGG CAG CCG CGA GAC CGC TTC GTA CGT CCT CAC CAA CGG CTC GGC ACG
Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro His Gln Arg Leu Gly Thr
90 95 100

CTT CGT CCT CAC CTC CGT CAT CAA GCC CGC CAC CCC CTG GGG CCA CTT
Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg His Pro Leu Gly Pro Leu
105 110 115

CCT CGC CGA CCA TGT GGC CGA GCA CGG CGA CGG CGT CGT CGA CCT CGC
Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg
120 125 130

CAT CGA GGT CCC GGA CGC CCG CGC CCA CGC GTA CGC GAT CGA GCA
His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro Arg Val Arg Asp Arg Ala
135 140 145 150

CGG CGC CCG CTC GGT CGC CGA GCC GTA CGA GCT GAA GGA CGA GCA CGG
Arg Arg Pro Leu Gly Arg Ala Val Arg Ala Glu Gly Arg Ala Arg
155 160 165

CAC GGT CGT CCT CGC CGC GAT CGC CAC CTA CGG CAA GAC CCG CCA CAC
His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu Arg Gln Asp Pro Pro His
170 175 180

CCT CGT CGA CCG GAC CGG CTA CGA CGG CCC CTA CCT CCC CGG CTA CGT
Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro Leu Pro Pro Arg Leu Arg
185 190 195

GGC CGC CGC CCC GAT CGT CGA ACC GCC CGC CCA CCG CAC CTT CCA GGC
Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg Pro Pro His Leu Pro Gly
200 205 210

CAT CGA CCA CTG CGT CGG CAA CGT CGA GCT CGG CCG GAT GAA CGA ATG
His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Arg Met
215 220 225 230

GGT CGG CTT CTA CAA CAA GGT CAT GGG CTT CAC GAA CAT GAA GGA GTT
Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu His Glu His Gly Val
235 240 245

CGT GGG CGA CGA CAT CGC GAC CGA GTA CTC GGC GCT GAT GTC GAA GGT
Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu Gly Ala Asp Val Glu Gly
250 255 260

CGT GGC CGA CGG CAC GCT CAA GGT CAA GTT CCC GAT CAA CGA GCC CGC
Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val Pro Asp Gln Arg Ala Arg
265 270 275

CCT CGC CAA GAA GAA GTC CCA GAT CGA CGA GTA CCT GGA GTT CTA CGG
Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg Val Pro Gly Val Leu Arg
280 285 290

CGG CGC GGG CGT CCA GCA CAT CGC GCT GAA CAC GGG TGACATCGTC
Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu His Gly
295 300 305

GAGACGGTAC GCACGATGCG CGCCGCCGGC GTCCAGTTCC TGGACACGCC CGACTCGTAC
TACGACACCC TCGGGGAGTG GGTGGGCGAC ACCCGCGTCC CCGTCGACAC CCTGCGCAG
CTGAAGATCC TCGCGGACCG CGACGAGGAC GGCTATCTGC TCCAGATCTT CACCAAGCCG

1205
1265
1325

GTCCAGGACC GCCCGACGGT CTTCTTCGAG ATCATCGAAC GCCACGGCTC GATGGGATTC
GGCAAGGGCA ACTTCAAGGC CCTGTCGAG GCGATCGAGC GGGAGCAGGA GAAGCAGGGC
AACCTGTAGG CGGCGCGGCC CGGG

1385
1445
1469

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 306 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gln Pro His Ala Met Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly
1 5 10 15
Gln Ala Asn Tyr Cys Ala Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His
20 25 30
Asp Ala Asp His Thr Pro His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro
35 40 45
Leu Pro Gly Glu Gly Asn Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg
50 55 60
Gln Ala Gly Arg Ala Leu Leu His Arg Leu Arg His Ala Ala Cys Gly
65 70 75 80
Val Leu Arg Thr Gly Glu Arg Gln Pro Arg Asp Arg Phe Val Arg Pro
85 90 95
His Gln Arg Leu Gly Thr Leu Arg Pro His Leu Arg His Gln Ala Arg
100 105 110
His Pro Leu Gly Pro Leu Pro Arg Arg Pro Cys Gly Arg Ala Arg Arg
115 120 125
Arg Arg Arg Arg Pro Arg His Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Arg Pro
130 135 140
Arg Val Arg Asp Arg Ala Arg Arg Pro Leu Gly Arg Arg Ala Val Arg
145 150 155 160
Ala Glu Gly Arg Ala Arg His Gly Arg Pro Arg Arg Asp Arg His Leu
165 170 175
Arg Gln Asp Pro Pro His Pro Arg Arg Pro Asp Arg Leu Arg Arg Pro
180 185 190
Leu Pro Pro Arg Leu Arg Gly Arg Arg Pro Asp Arg Arg Thr Ala Arg
195 200 205
Pro Pro His Leu Pro Gly His Arg Pro Leu Arg Arg Gln Arg Arg Ala
210 215 220
Arg Pro Asp Glu Arg Met Gly Arg Leu Leu Gln Gln Gly His Gly Leu
225 230 235 240
His Glu His Glu Gly Val Arg Gly Arg Arg His Arg Asp Arg Val Leu
245 250 255
Gly Ala Asp Val Glu Gly Arg Gly Arg Arg His Ala Gln Gly Gln Val
260 265 270
Pro Asp Gln Arg Ala Arg Pro Arg Gln Glu Glu Val Pro Asp Arg Arg
275 280 285
Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu

36

00

290

295

His Gly

305

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1479 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1401

(x) VERÖFFENTLICHUNGSSINFORMATION:

(A) AUTORS: 3-SEP-2000,

(G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATG GCG ACG ACG GTT ACA CTC AAA TCC TTC ACC GGA CTT CGT CAA TCA	48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser	
1 5 10 15	
TCA ACG GAG CAA ACA AAC TTC GTC TCT CAT GTA CCG TCA TCA CTT TCT	96
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
CTC CCT CAA CGA CGG ACC TCT CTC CGA GTA ACC GCA GCC AGG GCC ACT	144
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr	
35 40 45	
CCC AAA CTC TCC AAC CGT AAA CTC CGT GTC GCC GTC ATC GGT GGT GGA	192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly	
50 55 60	
CCA GCA GGC GGG GCA GCT GCA GAG ACT CTA GCA CAA GGA GGA ATC GAG	240
Pro Ala Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Ile Glu	
65 70 75 80	
ACG ATT CTC ATC GAG CGT AAG ATG GAC AAT TGC AAG CCT TGC GGT GGC	288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly	
85 90 95	
GCG ATT CCT CTC TGT ATG GTC GGA GAA TTC AAC TTG CCG TTG GAT ATT	336
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile	
100 105 110	
ATT GAT CGG AGA GTG ACG AAG ATG AAG ATG ATT TCG CCG TCG AAC ATT	384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile	
115 120 125	
GCT GTT GAT ATT GGT CGT ACG CTT AAG GAG CAT GAG TAT ATA GGT ATG	432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met	
130 135 140	
GTG AGA AGA GAA GTT CTT GAT GCT TAT CTG AGA GAG AGA GCT GAG AAG	480

Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys			
145	150	155	160
AGT GGA GCC ACT GTG ATT AAC GGT CTC TTC CTT AAG ATG GAT CAT CCG			528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro			
165	170	175	
GAG AAT TGG GAC TCG CCG TAC ACT TTG CAT TAC ACT GAG TAC GAT GGT			576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly			
180	185	190	
AAA ACT GGA GCT ACA GGG ACG AAG AAA ACA ATG GAG GTT GAT GCT GTC			624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val			
195	200	205	
ATT GGA GCT GAT GGA GCT AAC TCT AGG GTT GCT AAA TCT ATT GAT GCT			672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala			
210	215	220	
GGT GAT TAC GAC TAC GCA ATT GCA TTT CAG GAG AGG ATT AGG ATT CCT			720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro			
225	230	235	240
GAT GAG AAA ATG ACT TAC TAT GAG GAT TTA GCT GAG ATG TAT GTT GGA			768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly			
245	250	255	
GAT GAT GTG TCG CCG GAT TTC TAT GGT TGG GTG TTC CCT AAG TGC GAC			816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp			
260	265	270	
CAT GTA GCT GTT GGA ACA GGT ACT GTG ACT CAC AAA GGT GAC ATC AAG			864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys			
275	280	285	
AAG TTC CAG CTC GCG ACC AGA AAC AGA GCT AAG GAC AAG ATT CTT GGA			912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly			
290	295	300	
GGG AAG ATC ATC CGT GTG GAG GCT CAT CCG ATT CCT GAA CAT CCG AGA			960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg			
305	310	315	320
CCA CGT AGG CTC TCG AAA CGT GTG GCT CTT GTA GGT GAT GCT GCA GGG			1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly			
325	330	335	
TAT GTG ACT AAA TGC TCT GGT GAA GGG ATC TAC TTT GCT GCT AAG AGT			1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser			
340	345	350	
GGA AGA ATG TGT GCT GAA GCC ATT GTC GAA GGT TCA CAG AAT GGT AAG			1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys			
355	360	365	
AAG ATG ATT GAC GAA GGG GAC TTG AGG AAG TAC TTG GAG AAA TGG GAT			1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp			
370	375	380	
AAG ACA TAC TTG CCT ACC TAC AGG GTA CTT GAT GTG TTG CAG AAA GTG			1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val			
385	390	395	400

38

TTT TAC AGA TCA AAT CCG GCT AGA GAA GCG TTI GTG GAG ATG TGT AAT	1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn	
405 410 415	
GAT GAG TAT GTT CAG AAG ATG ACA TTC GAT AGC TAT CTG TAC AAG CGG	1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg	
420 425 430	
GTT GCG CCG GGT AGT CCT TTG GAG GAT ATC AAG TTG GCT GTG AAC ACC	1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr	
435 440 445	
ATT GGA AGT TTG GTT AGG GCT AAT GCT CTA AGG AGA GAG ATT GAG AAG	1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys	
450 455 460	
CTT AGT GTT TAAGAAACAA ATAATGAGGT CTATCTCCTT TCTTCATCTC	1441
Leu Ser Val	
465	
TATCTCTCTT TTTTGTCCTG TTAGTAATCT ATCTACAC	1479

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 467 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

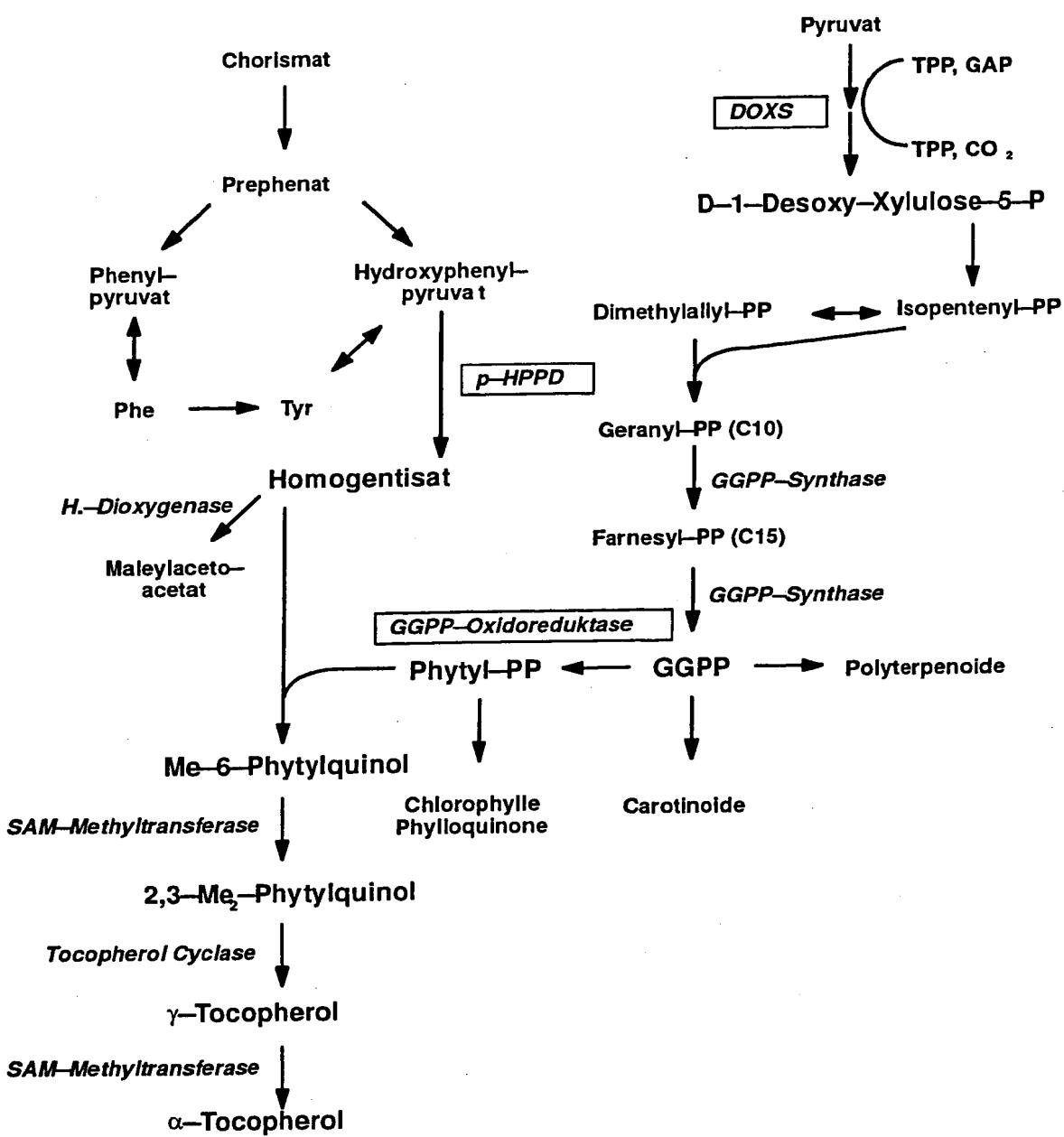
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser	
1 5 10 15	
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr	
35 40 45	
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly	
50 55 60	
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu	
65 70 75 80	
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly	
85 90 95	
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile	
100 105 110	
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile	
115 120 125	
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met	
130 135 140	
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys	
145 150 155 160	
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro	
165 170 175	
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly	
180 185 190	

39 230 205 220 235 240 255 265 270 285 295 300 315 320 330 335 345 350 360 365 375 380 395 400 410 415 425 430 440 445 455 460

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
195 200 205
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
210 215 220
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
225 230 235 240
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
245 250 255
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
260 265 270
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
275 280 285
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
290 295 300
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
305 310 315 320
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
325 330 335
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
340 345 350
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
355 360 365
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
370 375 380
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
385 390 395 400
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
405 410 415
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
420 425 430
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
435 440 445
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
450 455 460
Leu Ser Val
465

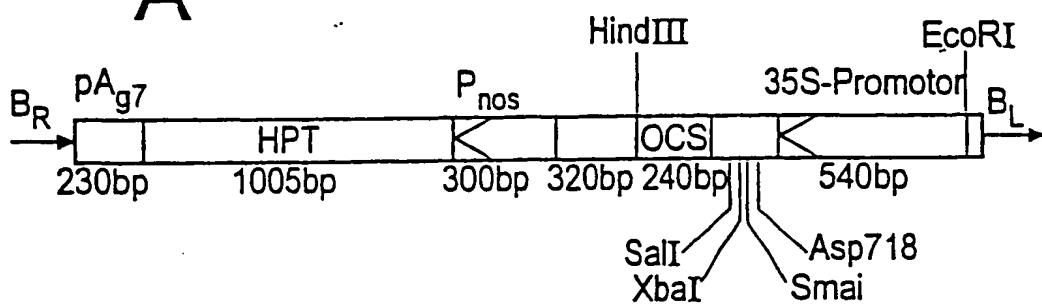
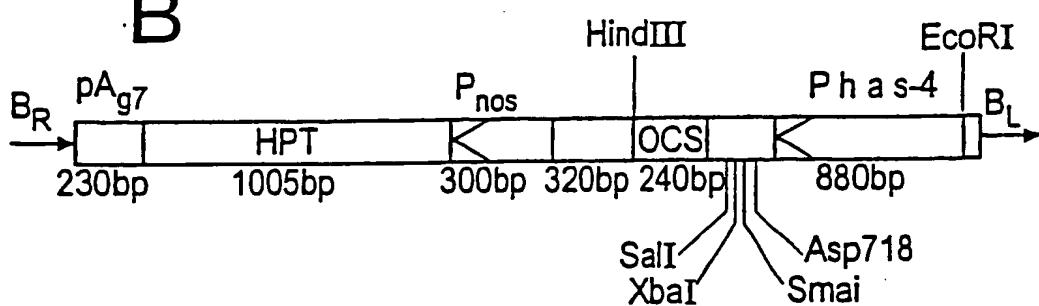
M 200 10.99

Abbildung



Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels

Abbildung 2

A**B**

M 28.10.99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im Zytosol transgener Pflanzen

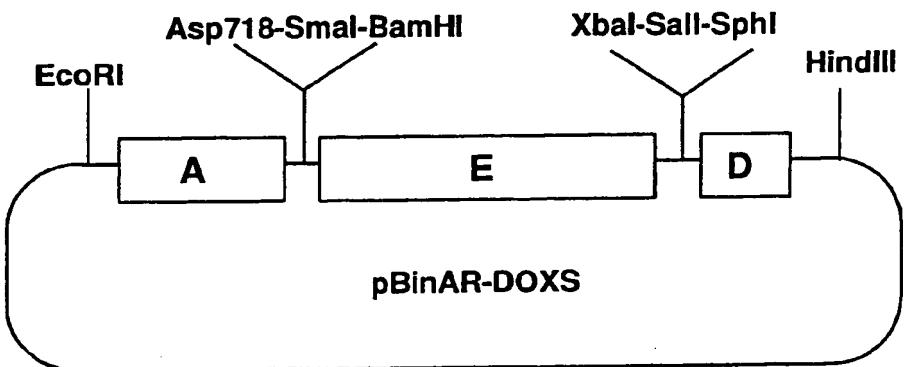
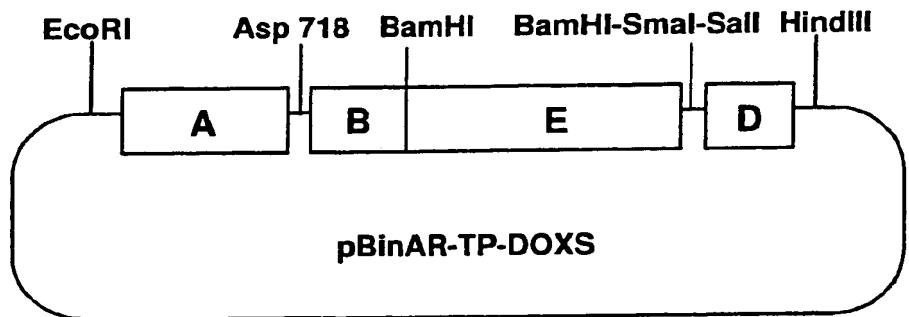


Abbildung 4

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im Plastiden transgener Pflanzen



M 20 · 0 · 99

Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Zytosol transgener Pflanzen

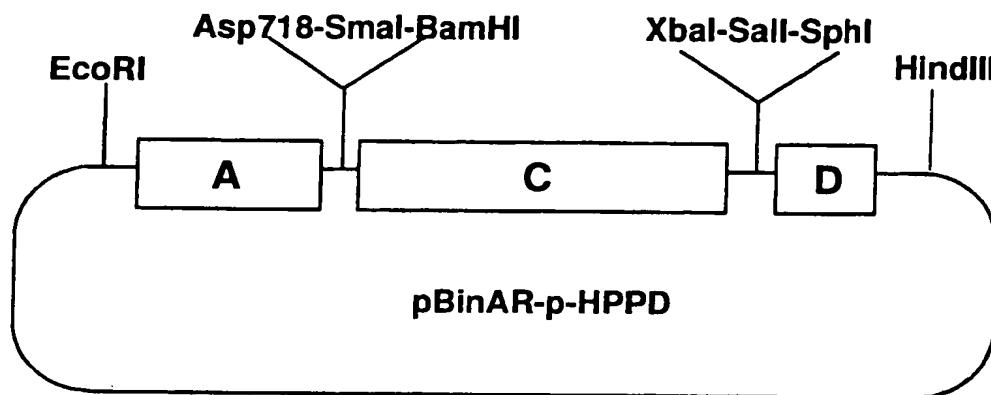
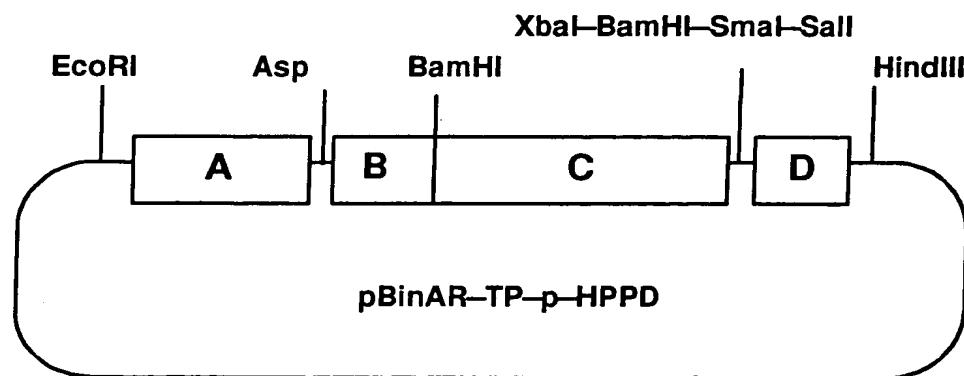


Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen



M 23.10.99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in Plastiden transgener Pflanzen.

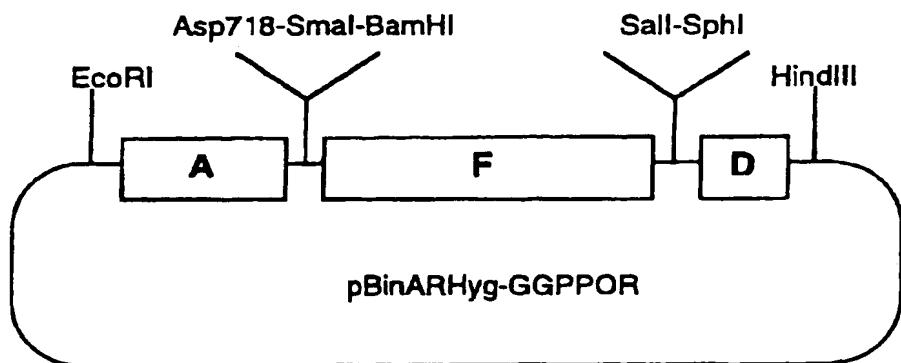
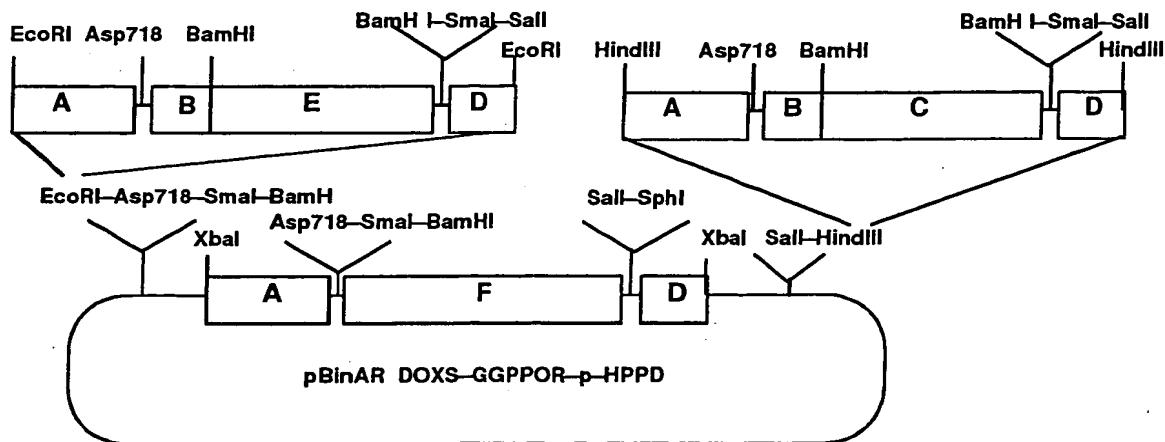


Abbildung 8

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.



M 20.10.98

DNA-Sequenzen codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranyl-
geranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in
5 Pflanzen

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E
10 Biosyntheseleistung durch Überexpression einer 1-Deoxy-D-Xylu-
lose-5-Phosphat Synthase aus *E.coli*, einer Hydroxyphenylpyruvat
Dioxygenase aus *Streptomyces avermitilis* und einer Geranylgera-
nyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase aus *Arabidopsis thaliana*.

15

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)